

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-049240

(43)Date of publication of application : 18.02.1992

---

(51)Int.Cl. A61K 35/74  
A61K 35/78  
A61K 35/78  
A61K 35/80  
A61K 35/84

---

(21)Application number : 02-155429 (71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK

MIZUNO DENICHI  
SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 15.06.1990

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO  
YOSHIMURA ATSUSHI  
TSUKIOKA DAISUKE  
MIZUNO DENICHI  
OSHIMA HARUYUKI

---

(54) ANTIPEPTIC ULCER AGENT AND ANTIPEPTIC ULCER AGENT FOR ANIMAL

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an antipeptic ulcer agent, containing a lipopolysaccharide (LPS) of a specific macrophage activating ability, having a high chemotherapeutic coefficient with hardly any side effects, suppleable in a large amount and capable of being blended even with ordinarily ingested foods.

CONSTITUTION: The subject antiulcer agent is obtained by containing an LPS in which the content of an LPS, positive to limulus tests and providing an ED50 of the macrophage activating ability is 0.4-100ng/ml culture solution when a sigmoid curve indicating the macrophage activating ability (%) by standardizing the activating ability to provide a TNF production of the macrophage without addition of the LPS to be 0% and the activating ability to afford the maximum constant amount of the TNF production to be 100% in the ordinate axis, and the LPS content positive to the limulus tests in the LPS on a logarithmic scale in the abscissa axis is plotted using the macrophage activating ability of the LPS to activate the TNF productivity of the macrophage cultured in vitro as an index. An LPS collected from bacteria or plants or synthetic lipid A, etc., can be used as the

LPS.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

平4-49240

⑫ Int. Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 35/74  
35/78  
35/80  
35/84

識別記号

ACL F  
U  
AEV X  
A  
Z  
A

庁内整理番号

9165-4C  
7180-4C  
7180-4C  
7180-4C  
7180-4C  
7180-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)2月18日

審査請求 未請求 請求項の数 76 (全25頁)

⑭ 発明の名称 抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤

⑮ 特 願 平2-155429

⑯ 出 願 平2(1990)6月15日

⑰ 発 明 者	杉 源 一 郎	東京都世田谷区東玉川1-10-21
⑰ 発 明 者	吉 村 淳	千葉県千葉市磯辺3-26-7
⑰ 発 明 者	月 岡 大 輔	千葉県千葉市春日1-21-17
⑰ 発 明 者	水 野 伝 一	神奈川県鎌倉市岡本18
⑰ 発 明 者	大 島 治 之	東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地2-10-513
⑰ 出 願 人	千葉製粉株式会社	千葉県千葉市新港17番地
⑰ 出 願 人	水 野 伝 一	神奈川県鎌倉市岡本18
⑰ 出 願 人	杉 源 一 郎	東京都世田谷区東玉川1-10-21

明 細 書

1 発明の名称

抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤

2 特許請求の範囲

(1) LPSを含む抗消化性潰瘍剤であり、  
インビトロで培養されるマクロファージのTNF  
産生能を活性化させるLPSのマクロファージ活  
性化能を指標とし、

縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロ  
ファージのTNF産生能を与えるマクロファージ  
活性化能を0%、マクロファージのTNF産生能  
を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活  
性化能を100%とするマクロファージ活性化能  
(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラスト  
陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド  
曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のE<sub>50</sub>を与えるリム  
ラスト陽性LPS含有量が0.4~100n

g/培養液mLであるLPSの少なくとも1種を  
含む抗消化性潰瘍剤。

(2) LPSが、植物から得られるLPS、  
細菌から得られるLPS及びリビドAからなる群  
から選択される、請求項1記載の抗消化性潰瘍剤。

(3) 植物が被子植物、単子葉類植物、双子  
葉類植物、シダ植物、ソウ類植物、菌類植物及び  
それらの混合物からなる群から選択されるもの  
である、請求項2記載の抗消化性潰瘍剤。

(4) 被子植物がマツ科マツ属植物である、  
請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(5) マツ科マツ属植物がマツである、請求  
項4記載の抗消化性潰瘍剤。

(6) 単子葉類植物がイネ科のイネ属植物、  
コムギ属植物、オオムギ属植物、カラス麦属植物、  
ササ属植物、ジュズダマ属植物、アヤメ科のフヤ  
メ属植物、ユリ科のネギ属植物、キジカクシ属植  
物、ジャノヒゲ属植物、ショウガ科のショウガ属  
植物、ウコン属植物、サトイモ科ハンゲ属植物  
及びそれらの混合物からなる群から選択されるも

のである、請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(7) イネ科イネ属植物がイネである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(8) イネ科コムギ属植物が小麦である、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(9) イネ科オオムギ属植物が大麦、裸麦及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(10) イネ科カラス麦属植物が烏麦、燕麦及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(11) イネ科ササ属植物がクサ笹である、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(12) イネ科ジユズダマ属植物が稲麦である、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(13) アヤメ科アヤメ属植物がアヤメである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(14) ユリ科ネギ属植物がニンニクである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(15) ユリ科キジカクシ属植物がアスバラガ

物、カンゾウ属植物、ナス科のナス属植物、トマト属植物、トウガラシ属植物、バラ科のビワ属植物、サクラ属植物、クスノキ科アボガド属植物、クルミ科クルミ属植物、ウリ科のトウナス属植物、アマチャヅル属植物、アブラナ科ダイコン属植物、マタタビ科マタタビ属植物、ドクダミ科ドクダミ属植物、コショウ科コショウ属植物、シキミ科シキミ属植物、ニクズク科ニクズク属植物、ミカン科ミカン属植物、ウコギ科オタネニンジン属植物、セリ科サボシュニコピア属植物、ツツラフジ科オオツツラフジ属植物、アカネ科カギカズラ属植物及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(22) マメ科ダイズ属植物が大豆である、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(23) マメ科インゲンマメ属植物が小豆である、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(24) マメ科ソラマメ属植物がそら豆である、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(25) マメ科クズ属植物がクズである、請求

スである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(16) ユリ科ジャノヒゲ属植物がジャノヒゲである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(17) ショウガ科ショウガ属植物がミョウガである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(18) ショウガ科ウコン属植物がウコンである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(19) サトイモ科ハング属植物がカラスビシャクである、請求項6記載の抗消化性潰瘍剤。

(20) 小麦から得られるLPSが次の物性を有するものである、請求項8記載の抗消化性潰瘍剤。

分子量：8,000±1,000 (SDS電気泳動法)

リン数：1以上/分子量8千

ヘキサミン数：6±2/分子量8千

脂肪酸数：6±2/分子量8千

KDO数=5±1/分子量8千

(21) 双子葉類植物がマメ科のダイズ属植物、インゲンマメ属植物、ソラマメ属植物、クズ属植

物、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(26) マメ科カンゾウ属植物がナンキンカンゾウである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(27) ナス科ナス属植物がジャガイモ、トウガラシ及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(28) ナス科トマト属植物がトマトである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(29) ナス科トウガラシ属植物がトウガラシである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(30) バラ科ビワ属植物がビワである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(31) バラ科サクラ属植物がモモである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(32) クスノキ科アボガド属植物がアボガドである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(33) クルミ科クルミ属植物がクルミである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(34) ウリ科トウナス属植物がカボチャであ

る、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(35) ウリ科アマチャヅル属植物がアマチャヅルである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(36) アブラナ科ダイコン属植物がカイワレダイコンである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(37) マタタビ科マタタビ属植物がマタタビである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(38) ドクダミ科ドクダミ属植物がドクダミである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(39) コショウ科コショウ属植物が胡椒である、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(40) シキミ科シキミ属植物がダイウイキョウである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(41) ニクズク科ニクズク属植物がニクズクである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(42) ミカン科ミカン属植物がダイダイである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(43) ウコギ科オタネニンジン属植物がオタネニンジンである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(51) カッソウ属植物がコンブ科のワカメ属植物、コンブ属植物、ホンダワラ科ヒジキ属植物及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項50記載の抗消化性潰瘍剤。

(52) コンブ科ワカメ属植物がワカメである、請求項51記載の抗消化性潰瘍剤。

(53) コンブ科コンブ属植物がコンブである、請求項51記載の抗消化性潰瘍剤。

(54) ホンダワラ科ヒジキ属植物がヒジキである、請求項51記載の抗消化性潰瘍剤。

(55) 紅ソウ属植物がウシケノリ科アマノリ属植物である、請求項50記載の抗消化性潰瘍剤。

(56) ウシケノリ科アマノリ属植物がアサクサノリである、請求項55記載の抗消化性潰瘍剤。

(57) 緑ソウ属植物がオオシスティス科クロレラ属植物である、請求項50記載の抗消化性潰瘍剤。

(58) オオシスティス科クロレラ属植物がクロレラである、請求項57記載の抗消化性潰瘍剤。

瘍剤。

(44) セリ科サボシュニコピア属植物がボウフウである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(45) ツツラフジ科オオツツラフジ属植物がオオツツラフジである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(46) アカネ科カギカズラ属植物がウンカリア・ヒルスタである、請求項21記載の抗消化性潰瘍剤。

(47) シダ植物がトクサ科トクサ属植物、ゼンマイ科ゼンマイ属植物及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(48) トクサ科トクサ属植物がスギナである、請求項47記載の抗消化性潰瘍剤。

(49) ゼンマイ科ゼンマイ属植物がゼンマイである、請求項47記載の抗消化性潰瘍剤。

(50) ソウ属植物がカッソウ属植物、紅ソウ属植物、緑ソウ属植物、ランソウ属植物及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、

(59) クロレラから得られるLPSが次の物性を有するものである、請求項58記載の抗消化性潰瘍剤。

分子量 = 40,000 ~ 90,000 (SDS電気泳動法)

リン数 = 4 ± 1 / 分子量1万

ヘキサミン数 = 7 ± 1 / 分子量1万

脂肪酸数 = 6 ± 1 / 分子量1万

KDO数 = 2 ± 1 / 分子量1万

(60) 菌類植物が担子菌類植物、子ノウ菌類植物及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(61) 担子菌類植物がヒラタケ科マツオウジ属植物、キシメジ科のエノキタケ属植物、シメジ属植物、タコウキン科マイタケ属植物、サルノコシカケ科ポリボラス属植物、ハラタケ科ハラタケ属植物、キクラゲ科キクラゲ属植物、モエギタケ科スギタケ属植物及びそれらの混合物である、請求項60記載の抗消化性潰瘍剤。

(62) ヒラタケ科マツオウジ属植物が椎茸で

ある、請求項61記載の抗消化性潰瘍剤。

(63) キシメジ科エノキタケ属植物がエノキ茸である、請求項61記載の抗消化性潰瘍剤。

(64) キシメジ科シメジ属植物がシメジである、請求項82記載の抗消化性潰瘍剤。

(65) タコウキン科マイタケ属植物がマイ茸である、請求項81記載の抗消化性潰瘍剤。

(66) サルノコシカケ科ポリボラス属植物がアワビ茸である、請求項81記載の抗消化性潰瘍剤。

(67) ハラタケ科ハラタケ属植物がマッシュルームである、請求項61記載の抗消化性潰瘍剤。

(68) キクラゲ科キクラゲ属植物がキクラゲである、請求項61記載の抗消化性潰瘍剤。

(69) モエギタケ科スギタケ属植物がナメコである、請求項61記載の抗消化性潰瘍剤。

(70) 子ノウ属植物がエンドミセタセア科サッカロミセス属植物、バツカクキン科ノムシタケ属植物及びそれらの混合物である、請求項60記載の抗消化性潰瘍剤。

(71) エンドミセタセア科サッカロミセス属植物が、パン酵母、醸造用酵母及びそれらの混合物である、請求項70記載の抗消化性潰瘍剤。

(72) バツカクキン科ノムシタケ属植物が冬虫夏草である、請求項70記載の抗消化性潰瘍剤。

(73) 細菌が大腸菌、百日咳菌及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項3記載の抗消化性潰瘍剤。

(74) 大腸菌から得られるLPSが次の物性を有するものである、請求項73記載の抗消化性潰瘍剤。

分子量 =  $30,000 \pm 5,000$  (SD

S電気泳動法)

リン数 =  $12 / \text{分子量} 3 \text{万}$

ヘキソサミン数 =  $45 \pm 6 / \text{分子量} 3 \text{万}$

脂肪酸数 =  $18 / \text{分子量} 3 \text{万}$

KDO数 =  $5 \pm 1 / \text{分子量} 3 \text{万}$

(75) 百日咳菌から得られるLPSが次の物性を有するものである、請求項73記載の抗消化性潰瘍剤。

分子量 =  $6,000 \pm 1,000$

$9,000 \pm 1,000$

(SDS電気泳動法)

リン数 =  $5 / \text{分子量} 8 \text{千}$

ヘキソサミン数 =  $16 \pm 2 / \text{分子量} 8 \text{千}$

脂肪酸数 =  $5 / \text{分子量} 8 \text{千}$

KDO数 =  $2 \pm 1 / \text{分子量} 8 \text{千}$

(76) LPSを含む動物用抗消化性潰瘍剤であり、

インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化し、縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>を与えるリム

ラステスト陽性LPS含有量が0.4~100 ng / 培養液mlであるLPSの少なくとも1種を含む動物用抗消化性潰瘍剤。

## 3 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤に関する。

## 〔従来の技術〕

消化性潰瘍は、直接胃酸と接する消化管に発生する、少なくとも粘膜筋板をこえた、境界明瞭な限局性組織欠損であり、人畜共通な疾患である。臨床的にはしばしば、その発生部位に応じて胃潰瘍、十二指腸潰瘍、食道潰瘍という病名が使用されている。

消化性潰瘍の原因は、直接的には、胃酸やペプシンの異常な分泌亢進、粘膜の防御機構の弱体化、局所的貧血等であるが、現在、これらはストレスにより誘発されることが多い。動物では、牛、豚、鶏、犬、猫等で発症が報告されている。(昭和64年に養賢堂から発行された、吐山豊秋著の「新編家畜薬理学」の224～226頁)。

## 〔課題を解決するための手段〕

本発明により、LPSを含む抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤が提供される。この抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤には、

インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、

縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大かつ一定の値(本明細書の他の箇所においては、「最大恒量」と称す)にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>を与えるリムラスト陽性LPS含有量が0.4～100ng/培養液mlであるLPSの少なくとも1種が

消化性潰瘍治療の2本柱は過去、現在を通じて制酸剤、自律神経遮断剤である。

## 〔発明が解決しようとする課題〕

消化性潰瘍は、一旦発生すると治療後も生癰にわたって再発治療をくりかえすので、連続投与しても副作用の発生のない薬剤が望まれている。この点で、現在使用されている自律神経遮断剤はいずれも満足すべきものではない。又、消化性潰瘍は、前述の通り、ストレスから誘発されることが多いので、日常的に摂取される食品にも配合可能な予防効果がある薬剤の開発が強く望まれている。

かかる現状に鑑み、本発明は、抗消化性潰瘍効果が高く副作用が少なく、従って化学療法係数が高く、かつ、生産コストが低く、しかも、経口、経皮、注射での投与が可能であり、かつ大量に供給可能であり、その上、毎日食することが可能な食品の内に配合可能な新規な抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤を提供するために完成されたものである。

含まれる。

ここで「少なくとも1種を含む」とは、本発明のLPSは各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更には他のいずれの物質とも組み合わせ使用できることを意味する。

「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。「TNF」は、マクロファージにより産生される腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor)の総称であり[1985年に発行されたザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(The Journal of Biol. Chem., 260, 2345～2354頁)、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。

「リムラスト」は、1968年にレヴィン

(Levin) により創案された、カプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法である。

本発明の抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤の活性成分として使用できるLPSは、特にその採取源、生産方法、精製方法を限定されることはない。例えば、細菌や植物から採取されるLPSであっても、或は合成リビドAのような合成品であってもよい。なお、本明細書、特にその特許請求の範囲において、採取源は特に名称で特定されたそのものに限定されることなく、その採取源の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのものが含まれる。例えば、「小麦LPS」と特定された場合には、小麦そのものから採取されたLPSのみならず、小麦の成長、保存、流通の過程で付着、共存する細菌その他の全てのものが含まれるものと理解されたい。なぜならば、特に寄生植物、寄生動物という関係が解明されているもの以外にも、特定の植物、動物、菌界生物、地衣界生物に、それらにより付着、共存

を許されたものが棲息している例が多く存在し得ることは当業界で良く知られていることであるからである。

これらLPSのうちから、本発明の抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤の活性成分として使用できるLPSを選択するには、

インビトロで培養されるマクロファージのTNF産生能を活性化するLPSのマクロファージ活性化能を指標とし、

縦軸に、そのLPSを添加しないときのマクロファージのTNF産生量を与えるマクロファージ活性化能を0%、マクロファージのTNF産生量を最大恒量にする時のLPSのマクロファージ活性化能を100%とするマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸に、そのLPSのリムラステスト陽性LPS含有量を対数尺で表すシグモイド曲線を描くとき、

マクロファージ活性化能のED<sub>50</sub>を与えるリムラステスト陽性LPS含有量が0.4~100ng/培養液mlであるものを選択すればよい。

なお、本明細書に記載した植物が帰属する科名、属名は、次の文献の記載を照合して決定された。

裸子植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類：昭和57年(正編)、昭和58年(続編)に北陸館から発行された「原色牧野植物大図鑑」の記載を照合して所属を決定した。但し、「落葵」は、昭和45年に女子栄養大学出版部から発行された「食用植物図説」と、昭和58年に至文堂から発行された「新日本植物誌要花鑑」の記載を照合し、「蕎麦」は、昭和46年に東京同文書院から発行された「総合食品事典」の記載を照合し、「蕎麦」、「カラスビシャク」、「ジャノヒゲ」、「ウコン」、「マタタビ」、「アマチャヅル」、「ドクダミ」、「胡椒」、「トウガラシ」、「ダイウイキョウ」、「ダイダイ」、「クズ」、「ナンキンカンゾウ」、「オタネニンジン」、「ボウフウ」、「オオツツラフジ」、「ウンカリヤ・ヒルスタ」は、昭和63年に北陸館から発行された「原色牧野和漢要草大図鑑」の記載を照合し、

#### リムラステスト陽性細菌源LPS

従来より知られている大腸菌LPS、百日咳菌LPS、リビドA等が該当する。

大腸菌LPSは、例えば、米国ディフコ(Difco)社から市販されている。

百日咳菌LPSは、例えば、フナコシ薬品から市販されている。又、公知の百日咳菌、例えば、寒炭株I相菌の死菌体から、例えば、下記文献記載の公知方法により調製することもできる。

ウェブスター(Webster)等著の「ジェイ・イミュノル(J. Immunol.)」、744、55(1955)；

ウェストファル(Westphal)等著の「ツェット・ナツールフォルシュ(Z. Naturforsch.)」、76、148(1952)。

リビドAは、例えば、第一化学薬品から市販されている。

#### リムラステスト陽性植物源LPS

原料植物として使用できるものを下記に例示す



「アボガド」は、昭和53年に財団法人農林統計協会から発行された熱帯農業技術叢書第15号「ブラジルの果実」の記載を照合し、「カイワレダイコン」は、昭和59年に北陸館から発行された「原色園芸植物大図鑑」の記載を照合し、「ニクスク」は、昭和44年に廣川書店から発行された「図説熱帯植物集成」の記載を照合し、「クロレラ」は、財団法人日本健康食品協会が昭和61年に公示した、「クロレラ規格基準」の記載を照合して所屬を決定した。

菌類：昭和62年に保育社から発行された「原色日本新菌類図鑑」の記載を照合して所屬を決定した。但し、酵母は、昭和37年に技報堂から発行された「微生物ハンドブック」の記載を照合し、「冬虫夏草」は、前掲の「原色牧野和漢要草大図鑑」の記載を照合して所屬を決定した。

本発明で利用できる原料植物は、例えば、藻類植物、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類、菌類の植物であり、これらは個別に或は混合して使用できる。

トマト、ナス科トウガラシ属植物であるトウガラシ、バラ科ビワ属植物であるビワ、バラ科サクラ属植物であるモモ、クスノキ科アボガド属植物であるアボガド、クルミ科クルミ属植物であるクルミ、ウリ科トウナス属植物であるカボチャ、ウリ科アマチャツル属植物であるアマチャツル、アブラナ科ダイコン属植物であるカイワレダイコン、マタタビ科マタタビ属植物であるマタタビ、ドクダミ科ドクダミ属植物であるドクダミ、コショウ科コショウ属植物である胡椒、シキミ科シキミ属植物であるダイウイキョウ、ニクズク科ニクズク属植物であるニクズク、ミカン科ミカン属植物であるダイダイ、ウコギ科オタネニンジン属植物であるオタネニンジン、セリ科サボシユニコピア属植物であるボウフウ、ツツラフジ科オオツツラフジ属植物であるオオツツラフジ、アカネ科カギカスラ属植物であるウンカリア・ヒルスタを使用できる。

シダ植物としては、例えば、トクサ科トクサ属植物であるスギナ、ゼンマイ科ゼンマイ属植物で

藻類植物としては、例えば、マツ科マツ属植物であるマツを使用できる。

単子葉類植物としては、例えば、イネ科イネ属植物であるイネ、イネ科コムギ属植物である小麦、イネ科オオムギ属植物である大麦、粟、イネ科カラス麦属植物である烏麦、燕麦、イネ科ササ属植物であるクサ笹、イネ科ジユズゲマ属植物である蕎麦、アヤメ科アヤメ属植物であるアヤメ、ユリ科ネギ属植物であるニンニク、ユリ科キジカクシ属植物であるアスバラガス、ユリ科ジャノヒゲ属植物であるジャノヒゲ、ショウガ科ショウガ属植物であるミョウガ、ショウガ科ウコン属植物であるウコン、サトイモ科ハング属植物であるカラスビシャクを使用できる。

双子葉類植物としては、マメ科ダイズ属植物である大豆、マメ科インゲンマメ属植物である小豆、マメ科ソラマメ属植物であるそら豆、マメ科クズ属植物であるクズ、マメ科カンゾウ属植物であるナンキンカンゾウ、ナス科ナス属植物であるジャガイモ、トウガラシ、ナス科トマト属植物である

あるゼンマイを使用できる。

ソウ類植物としては、例えば、カッソウ類植物、紅ソウ類植物、緑ソウ類植物、ランソウ類植物を使用できる。カッソウ類植物としては、例えば、コンブ科ワカメ属植物であるワカメ、コンブ科コンブ属植物であるコンブ、ホンダワラ科ヒジキ属植物であるヒジキを使用できる。紅ソウ類植物としては、例えば、ウシケノリ科アマノリ属植物であるアサクサノリを使用できる。緑ソウ類植物としては、例えば、オオシスティス科クロレラ属植物であるクロレラを使用できる。

菌類植物としては、例えば、担子菌類植物、子ノウ菌類植物を使用できる。担子菌類植物としては、例えば、ヒラタケ科マツオウジ属植物である椎茸、キシメジ科エノキタケ属植物であるエノキ茸、キシメジ科シメジ属植物であるシメジ、タコウキン科マイタケ属植物であるマイ茸、サルノコシカケ科ポリボラス属植物であるアワビ茸、ハラタケ科ハラタケ属植物であるマッシュルーム、キクラゲ科キクラゲ属植物であるキクラゲ、モエギ

タケ科スギタケ属植物であるナメコを使用できる。子ノウ菌類植物としては、例えば、エンドミセタセア科サツカロミセス属植物であるパン酵母、醸造用酵母を使用できる。醸造用酵母にはビール酵母、清酒酵母、葡萄酒酵母、醬油酵母、味噌酵母等の他、サツカロミセス セレヴィシドに属する多くの酵母（例えば、ウイスキーや老酒の製造に使用される酵母）が含まれる。又、バツカクキン科ノムシタケ属植物である冬虫夏草も使用できる。

以上に述べた原料植物中のリムラステスト陽性 LPS の検出、含量測定は、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラースystem という名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。即ち、原料植物を同システムの LS-1 セットと合わせて発色させ、その発色の強さを、同じく同セットの E-2 セットを使用して作成した検量線と対比させればよい。

植物体 LPS は、以下に述べる方法で分離、精製できる。

①原料植物を必要に応じて適宜細切、乾燥、粉

粒度により異なるが、穀類種子の場合にはその割合が 70 w/v % 以下、望ましくは 20 ~ 50 w/v % 程度とすると操作上便宜である。更に、攪拌の速度は、起泡を引き起こさない程度のものとするのが好ましい。なお、この段階の操作迄、本発明のリムラステスト陽性植物 LPS の純度は、リムラステスト活性データから判断して、例えば小麦種子の場合には約 30 倍に上昇する。

以下、穀類種子を原料として使用する場合は例にとり説明するが、いわゆる当業者であれば、以下の記載を参考にして、他植物から夾雑する糖、蛋白等を除去してリムラステスト陽性 LPS を高純度で回収する方法を実施することは極めて容易である。

②純度を更に上げるためには、上記①で得られた上清を常法に従って限外濾過に付して分子量 5000 以下の成分を除去すればよい。

③得られた乾燥品を、50 mg/ml になるように蒸留水に懸濁し、遠心分離操作に付して上清を回収する。

④沈した後に蒸留水によく懸濁し、上清を回収する。

例えば、原料植物が穀類の種子である場合は、種皮をつけたまま、或は、種皮を除いた後に簡単に砕くか、又は、食用に供せられている程度の粉末になるまで粉砕し、得られた粉末に水を加えて分散液とし、攪拌した後に沈降物を静置又は遠心分離により除去するか、粉末に水を加えて練って得られるドウをミキサー中でゆるやかに水洗し、沈降物を除去すればよい。

原料植物がクロレラである場合には、まず細胞膜を破砕し、エタノール洗浄により脂溶性物質を除去した後に水抽出するとよい。

この水抽出の際の原料植物の粒度、水の温度、液性、添加量、攪拌の速度、時間、遠心分離の際の条件等は特に制限する必要はなく、原料植物の種類に応じて適宜調整すればよい。又、抽出水の温度は高い方が LPS の採取量、純度ともに高い傾向があるが、操作の便宜上、原料植物に含まれる澱粉の糊化を招来しない 50℃ 以下とすることが好ましい。又、水の添加量は、原料植物の種類、

④この上清を氷水で冷却し、酸を添加して酸性にすると沈殿が生じる。この際使用する酸は特定のものである必要はなく、例えば、トリクロロ酢酸（以下、TCA と称す）、過塩素酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸を使用できる。

⑤次いで、遠心分離操作に付して沈殿を回収して蒸留水で洗浄し、再度遠心分離操作に付して沈殿を回収する。

⑥沈殿を蒸留水に懸濁し、沈殿が溶解するまでアルカリを加える。この際使用するアルカリも特定のものである必要はなく、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウムを使用できる。沈殿の溶解時に塩基性が pH 11 より大きくなると目的の LPS が失活するので注意が必要である。

⑦次いで酸を加えて pH 8 としてから 37℃ に加温し、更に酸を加えて酸性にすると沈殿が生ずるので、37℃ に保温した遠心分離器を使用して遠心分離操作に付す。なお、この際使用する酸も特定のものである必要はない。

④上清を回収して氷冷し、4℃で再び遠心分離操作に付す。

⑤上清を回収し、アルカリを添加して中和し、常法に従って限外濾過で濃縮する。この際使用するアルカリも特定のものである必要はない。

⑥次いで常法に従ってゲル濾過に付して、リムラステスト陽性画分を回収して併せる。ゲル濾過用の担体としては、例えばセファデックス (Sephadex) G-75、G-100、セファクリル (Sephacryl) S-200、セファローズ (Sephacrose) 6B [以上は米国ファルマシア社 (Pharmacia Inc.) 製]、バイオゲル (Biogel) P-100 [米国バイオラッド (Biorad Inc.) 社製]、トーヨーパール HW-50、HW-55 (東洋曹達工業社製) を使用できる。緩衝液は pH 3~10 のものならいずれでもよい。例えば、トリス-HCl またはリン酸緩衝液を使用できる。

⑦次いでこの画分に蛋白分解酵素を加え、37

℃で2時間以上インキュベーションして残存蛋白質を分解し、得られた酵素処理液を常法に従って限外濾過により濃縮する。なお、この際使用する蛋白分解酵素も特定なものである必要はなく、例えば、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシン、サーモライシンを単独で、或は任意に組み合わせて使用できる。市販品としては、例えば、プロナーゼ E (科研化学社)、プロティネース K (メルク社) を使用できる。

⑧次いでこの画分を常法に従って、例えば、米国ファルマシア社製の FPLC システムでファルマシア社製のモノ Q-セファローズ (Sephacrose)、Q-セファローズ (Sephacrose) を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付してリムラステスト陽性画分を得る。

⑨次いで、常法に従って脱塩のためにゲル濾過に付してリムラステスト陽性画分を回収する。

以上の操作により、小麦種子の場合には、当初のリムラス活性の約 20% が回収され、純度約 95% の精製標品が得られる。又、段階①終了時の

純度に比べ約 1000 倍の純度 (小麦種子の場合) になる。

以上の方法によって得られたリムラステスト陽性植物 LPS はそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

#### LPS がマクロファージのインビトロ TNF 産生能を活性化する方法

動物体内に TNF を産生させるためには、産生前駆 (プライミング) 段階と産生開始 (トリガリング) 段階とが必要であることは、カースウェル (Carswell) らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 3666~3670 頁 (1975 年)] に報告されている。プライミング段階開始のために投与される要剤が

「プライマー」 (内因性 TNF 産生促進剤) であり、トリガリング段階開始のために投与される要剤が「トリガー」 (内因性 TNF 産生剤) である。

LPS がマクロファージのインビトロ TNF 産生能を活性化する能力を測定するには、マウスのマクロファージ腹腔常在細胞を採取し、これにプライマーとしての組み換えマウス IFN- $\gamma$  を添加し、次いで、トリガーとしての LPS を添加し、その TNF 活性を測定すればよい。

TNF 活性は、L-929 細胞 [プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72, 3666~3670 頁] に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

L929 細胞を、5% 仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地 (以下、MEM 培地と表す) で育成し、 $8 \times 10^4$  個の細胞が  $100 \mu\text{L}$  の同上培地に含まれる様にし、96 穴の平底プレートで育種する。育種条件は 37℃、2 時間、5%  $\text{CO}_2$ 、100%  $\text{H}_2\text{O}$  であり、通常

の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクトノマイシンDを培地中に終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、培養液の液量を $150\mu\text{l}$ とする。即座に、検体を適当にMEM培地で稀釈したものを $50\mu\text{l}$ 加える（この順陽転率を適宜調整し、ED<sub>50</sub>を求める事ができる）。更に、最終液量 $200\mu\text{l}$ となつたし929細胞を上記条件で18時間培養する。

細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD<sub>550nm</sub>での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

し929細胞が50%生存できる検体の稀釈率(N)を求める。対照としてウサギTNS【腫瘍

障害血清(Tumor Necrosis Serum)]を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/ml)を $2.4 \times 10^5$ 単位/mlのTNF- $\alpha$ を用いて決定する。このウサギTNSのED<sub>50</sub>を与える稀釈率(C)を求める。

$$\text{検体活性(単位/ml)} = \frac{N}{C} \times n \text{ で計算する。}$$

#### 提供できる剤の製造方法

本発明の抗消化性潰瘍剤は、常法の製剤技術により、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤、注射剤等の形態で提供できる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤か顆粒剤とすることが好ましい。又、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために澱粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。本発明の抗消化性潰瘍剤を飼料添加剤、プレミックス製

剤として添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよい。

これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法により、賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、矯味剤、矯臭剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等のパラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。

以下、製造例、実施例、実験例により本発明を例示する。

#### 製造例1(小麦LPSの製造)

①小型ニーダに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉(アメリカ又はカナダ産のハードレットスプリング)(3,120g)を入れ、2.03%の蒸留水を加えて10分間練ってドウとした。15分間の静置後に10%の水を加えてゆるやかに攪拌してデンプン乳液を洗い出し、同時に可溶性成分を溶出させた。この溶出液を5℃の冷蔵庫中で12時間静置した後、デンプン等の沈降部を除去した。上澄み液を濃縮乾燥して201.1gの粉末を得た(粉末A)。

更に、残留ドウに5%の蒸留水を加えてゆるやかに攪拌し、以下、上記と同様に処理して40.1gの粉末を得た(粉末B)。

②これら粉末A、Bを米国アミコン社製限外濾過機HF-Lab1に供し、分子量面分5,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM5を、分子量面分10,000については中空系カートリッジHF-Lab1PM10を取り付けて限外濾過を行った[温度5~10℃、入圧25psi(1.76kg/cm<sup>2</sup>)、出圧15

$\text{psi} (1.06 \text{ kg/cm}^2)$  ]。その結果に基づき、各部分を次のように命名した。

粉末A：分子量5,000以下の部分をa<sub>1</sub>、

分子量5,000以上の部分をa<sub>2</sub>、

粉末B：分子量5,000以下の部分をb<sub>1</sub>、

分子量5,000以上の部分をb<sub>2</sub>、

粉末A：分子量10,000以下の部分をa<sub>1</sub>、

分子量10,000以上の部分をa<sub>2</sub>、

粉末B：分子量10,000以下の部分をb<sub>1</sub>、

分子量10,000以上の部分をb<sub>2</sub>、

これら各面分を後記実験例1に詳述する方法に従ってリムラステストに付したら、分子量5,000以上の面分には多量のリムラステスト陽性成分が存在するが、分子量5,000以下の面分にはほとんど存在しないことが確認された。

③上記粉末a<sub>2</sub>の30gを1ℓ三角フラスコに入れ、600mlの蒸留水を注いで、80分間スターラーで攪拌した後、日立冷却高速离心机SCR-20B（ローターRPR16を事前に4℃に冷却しておいた）で4℃で遠心分離操作（10,0

00g×10分）に付して上清を回収した。

④この上清を1ℓ三角フラスコに入れ、氷冷下（液温約2℃）、スターラーで攪拌しながら、事前に2℃に冷却してあった100%TCA水溶液20.5mlを滴下し、滴下終了後氷水中に10分間放置した。

⑤次いで前記と同様にして4℃で遠心分離操作（10,000g×10分）に付して沈殿を回収し、氷水中で冷却下、300mlの蒸留水と共に500mlのビーカーに入れて懸濁し、氷水中で冷却し、前記と同様にして4℃で遠心分離操作（10,000g×10分）に付して沈殿を回収した。

⑥この沈殿を1ℓビーカーに入れ、蒸留水500mlで懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液約3.5mlを使用して中和（pH7）し、ついで、氷水中で冷却しながら、1N水酸化ナトリウム溶液約2mlを添加して0.02N水酸化ナトリウム溶液になるようにして沈殿を溶解した。

⑦1N塩酸約1.5mlを加えてpH8とし、

次いで100mlの蒸留水を加えた後に1ℓ三角フラスコに移して37℃のインキュベーター内で30分間ゆっくり振盪した。

⑧100%TCA水溶液30mlを加えて混合した後、37℃のインキュベーター内で10分間ゆっくり振盪してから、約37℃に保温した遠心分離器トミーCD100R（トミー精器社製）を使用して遠心分離操作（3,000g×10分）に付した。

⑨上清を回収して氷冷し、4℃で遠心分離操作（10,000g×10分）に付した。

⑩上清を回収して10N水酸化ナトリウム溶液約3.6mlで中和してpH7とし、限外濾過器（東洋濾紙UHP-150、フィルター：UK-10、N<sub>2</sub>圧：4.0kg/cm<sup>2</sup>）で濃縮した。

⑪得られた濃縮液60mlを、セファロース（Sephacrose）6Bカラム〔米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製、カラムサイズ：5cm（内径）×100cm（2ℓ）〕を使い、ゲル濾過〔緩衝液：10mM

トリス-HCl/10mMNaCl（pH7.5）、流速：60ml/時〕に付して、各20mlの面分を得た。

⑫初めから43番目から56番目迄の面分280mlを併せ、プロナーゼE（科研化学社）450μgを加え、振盪下、37℃に2時間保温した後に、限外濾過器（東洋濾紙UHP-62、フィルター：UK-10、N<sub>2</sub>圧：4.0kg/cm<sup>2</sup>）で濃縮した。次いで、ファルマシア社製FPLCシステム（カラム：モノQHR10/10）を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl（pH7.5）と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl濃度が165mMに増加された組成を持つ緩衝液（200ml）でカラムを洗った。次いで、NaCl濃度を、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるように増加させながら全量400mlで目的LPSを溶出させ、各2mlの面分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてか

ら5～8番目の画分を併せて、LPS純度約92%の8mℓ[LPS:3.03mg(リムラステストによる大腸菌LPS換算値である。以下のLPS量も全てこの換算値である)、糖:0.23mg、蛋白:0.04mg)を回収した。

④次いでその8mℓを、セファデックス(Sephadex)G-25[カラム:2.0cm(内径)×20.2cm(66mℓ)]を使ってゲル濾過(緩衝液:水)に付して各3mℓの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9～12番目の画分を併せて、LPS純度約95%の12mℓ(LPS:2.7mg、糖:0.18mg、蛋白:0.03mg)を回収した。糖はフェノール-硫酸法で、蛋白はローリー法で測定した。なお、この画分は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより酸性であることを確認した。又、SDSゲル電気泳動法による分子量は6,000～10,000だった。

⑤上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら0.75mgあ

った。(以下、この凍結乾燥製品を小麦LPSと称す)

この小麦LPSのリムラス活性を後記実験例1記載の方法で測定したら2.7mgに相当するので、その比活性は

$$2.7 \div 0.75 = 3.6$$

になる。

また、夾雑物として存在し得る単糖の糖は、以上の精製により実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、小麦LPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階での小麦LPSの純度を重量に基づいて計算すると、

$$\text{蛋白} = 0.03 \text{ mg}$$

$$\text{LPS} = 0.75 - 0.03 = 0.72 \text{ mg}$$

だから、

$$0.72 \div 0.75 \times 100 = 96 (\%) \text{ である。}$$

#### 小麦LPSの物性

##### ⑤ 分子量

小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/ml

溶液を調製し、その4μℓを1.5mℓのトレフチューブに入れた。これに、別途、1mMのEDTAに2.5%SDS、5%メルカプトエタノール、10mMトリス塩酸(pH8.0)を加えて調製したSDS処理液1μℓを加え、この混液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム(Phast System)を使用し、電極との間にSDS-バッファー ストリップ(Buffer Strip)(ファルマシア社製)が介在せられた1μℓの上記混液をゲル[ファルマシア社製のファストゲルグラディエント(Phast Gel Gradient 8-25)に塗付し、最大電圧250v、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。

クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファストゲルブルー(Phast Gel Blue)Rを、脱色液として、メタノール:酢酸:蒸留水(容量比3:1:

6)混液を使用し、次の順序で染色・脱色を行った。

1)50℃で8分間染色

2)50℃で5分間脱色

3)50℃で8分間染色

4)50℃で10分間脱色

5)50℃で5分間保護(グリセロール、酢酸、

蒸留水の容量比5:10:85混液)

6)乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

1)50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比5:1:4混液)で処理

2)50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理

3)50℃で4分間、洗浄液(エタノール、酢酸

蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理

4)50℃で6分間、増感液(8.3%グルタルジアルデヒド)で処理

5)50℃で3分間、洗浄液(エタノール、酢酸

蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理

6) 50℃で5分間、洗浄液(エタノール、酢酸蒸留水の容量比10:5:85混液)で処理  
7) 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理

8) 50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理

9) 40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理

10) 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理

11) 30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理

12) 30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理

13) 30℃で4分間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理

14) 50℃で2分間、反応停止液(5%v/v%酢酸)で処理

5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調整し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度(OD<sub>820nm</sub>)を測定した。なお、検量線作製の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン重量としてそれぞれ2.5μg、1μg、0.25μg、0μgを含む0.5mlの溶液を調整して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。得られた結果を次表1に示す。

15) 50℃で3分間、保護液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85混液)で処理

#### 16) 乾燥

LPSは銀染色に染まるが、グマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、分子量8,000±1,000の位置に小麦LPSの主要染色帯が検出された。

#### ⑤ リン含有量

チェン-トリバラ(Chen-Toribara)法【チェン等著、"アナリティカルケミストリ"(Analytical Chemistry)、vol. 28、1756~1768頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。

小麦LPSを蒸留水に溶解して、25μgの小麦LPSを含む20μlの溶液を調整し、小試験管に入れた。20μlの50v/v%硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後、0.

表 1

OD <sub>820nm</sub>	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.002	0
0.150	0.25
0.620	1.0
1.559	2.5
	小麦LPS(4検体) (検量線から計算した リンの重量: μg)
0.036	0.1
0.073	0.2
0.104	0.3
0.139	0.4

注: 小麦LPSのデータは、無機リンの混入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。

小麦LPSの分子量を8,000と仮定し、上表の結果に基づいてその1分子当たりのリン数を次式により計算すると1~4になる。

$$\text{リン重量} \times 10^{-6} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{32}$$

上記実験でリン数が1~4と変動している原因の1つとしては、精製段階でのモノフォスホエステラーゼの混入により、リン酸が脱離したことも考えられる。

#### ④ヘキサミン含有量

エルソン-モルガン(Eison-Morgan)法(東京化学同人出版「生化学実験講座」No.4の377~379頁)に準拠して次の通りに行った。

小麦LPSを蒸留水に溶解して1mg/mlの溶液を調製し、その100μlをスクリーキャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100μlの8NHClを添加して110℃で16時間加熱した。4NNaOHを約200μl添加してpH7とした。その100μlを分取し、

ガリン酸を加えた。1.0mlの0.5Mナトリウムメチラートを加えて脂肪酸エステル加水分解とエステル化を行った。室温で1時間放置後に960μlの0.5NHClを加えて中和した。これに2mlのヘキサンを加えて15分間激しく攪拌した。次いで、1,000gで5分間遠心分離を行いヘキサン層を分取した。窒素ガスでヘキサンを蒸発させて、約20μlになるまで濃縮した。

このサンプルをガスクロマトグラフィー[本体:島津社製のGC8APF、キャピラリーカラム:カナダのスペルコ(Speco)社製FSCAP Sp2330、キャリアガス:窒素]に付して脂肪酸量を測定した。脂肪酸量測定の基準としては、第一化学薬品社製の合成リビドAである大腸菌型LA-15-PPP(分子量2,000で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている)を用いた。

結果、小麦LPSの脂肪酸数は6±2/分子(仮定分子量8,000)であると推定された。

別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200μlの下記試薬Aを加えた後に、105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

(試薬A)75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製。

(試薬B)1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製。

結果、小麦LPSのヘキサミン数は6±2/分子(仮定分子量8,000)だった。

#### ⑤脂肪酸含有量

80μlの小麦LPS蒸留水溶液(1mg/ml)に10μlの内部標準(0.55mMのマル

上記ガスクロマトグラフィーで観察されたチャートを添付図面第1~3図に示す。第1図は小麦LPSの、第2図は大腸菌LPSの、第3図は百日咳菌LPSのチャートである。

第1~3図において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間(分)は次の通りであった。

第1図: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.450
2	2.758
第2図: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.417
2	2.742
第3図: <u>ピーク番号</u>	<u>保持時間(分)</u>
1	2.433
2	3.028

第1~3図の比較により、小麦LPSのチャートは大腸菌LPSのチャートに似ているが、百日咳菌LPSのものとは大きく異なることは明白である。



## ④ K D O 含有量

K D O (2-ケト-3-デオキシオクトネート) 含有量をジフェニルアミン法【シャビール (Shabby R.) 等著、アナリティカル バイオケム (Analytical Biochem.), 58 (1), 123~129頁 (1974年)】に準拠して次の通りに行った。

500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの水酢酸、50mlの濃塩酸(全て和光純薬社製)を合わせてK D O 検出試薬を調製した。その500μlに、1.05mg/mlの小麦L P Sを含む蒸留水250μlを合わせ、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱後に冷水(23℃)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、630、650nmでの紫外吸収を測定した(それぞれA<sub>420</sub>、A<sub>470</sub>、A<sub>630</sub>、A<sub>650</sub>とする)。標準試料としては、127μg/mlのK D O アンモニウム塩【米国シグマ(Sigma)社製】を含む蒸留水250μlを使用した。

カラム：Q-セファロース(φ3cm×23cm、容量約180ml)

緩衝剤：10mMトリス-HCl(pH7.5)、NaCl濃度勾配：10mM、400mM、1M

流速：100~200ml/時

温度：室温

⑤ 蒸通りした画分310mlをグルコファミラーゼで処理して澱粉を分解した(pH5.0、40℃、約2時間)。澱粉の分解は、ヨウ素澱粉反応で着色が生じないことにより確認した。

⑥ 遠心分離(10,000g×10分)に付して上清を回収し、10N NaOH溶液で中和してpH7とし、分子量20万カットのポアサイズを有するウルトラフィルターを使って膜外濾過して、分解物の除去及び濃縮を行った。

⑦ 得られた濃縮液30mlをファルマシア社製F P L C システム(カラム：モノQHR10/10)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HClと10m

MのNaClを含む緩衝液(pH7.5)で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl量が165mMに増加された組成をした液(200ml)でカラムを洗った。次いで、目的L P Sを溶出するため、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlでカラムを洗い、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5~8番目の画分を併せた。

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650}$$

検体試料の値(S<sub>r</sub>)は0.379、標準試料の値(S<sub>s</sub>)は0.294であった。この値の比較により、小麦L P Sには5±1モル/分子量8千のK D Oが含まれると推定された。

## 製造例2(クロレラL P Sの製造)

① 細胞膜破壊クロレラ(關マンナンフーズ社製)30gを、洗浄液が緑色に着色しなくなるまでエタノールで洗浄した。

② この洗浄残渣26gを100mg/mlの濃度で蒸留水に溶かし、45℃で2時間振盪後に遠心分離操作(4℃、10,000g×30分)に付した。

③ 上清を回収し、東洋濾紙No.2で濾過し、次いで蒸留水で抽出した。

④ 抽出液290mlを下記条件で陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。

MのNaClを含む緩衝液(pH7.5)で試料をカラムに付した後、上記緩衝液でNaCl量が165mMに増加された組成をした液(200ml)でカラムを洗った。次いで、目的L P Sを溶出するため、165mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlでカラムを洗い、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5~8番目の画分を併せた。

⑤ 次いでその8mlを、セファデックス(Sephadex)G-25[カラム：2.0cm(内径)×20.2cm(66ml)]を使ってグルコース(緩衝液：水)に付して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9~12番目の画分を併せて12mlを回収した(L P S：14.3mg、糖：2.0mg、蛋白：0.53mg)。L P Sは後記実験例1記載の方法で、糖はフェノール-硫酸法で、蛋白はローリー法で測定した。

⑥ 上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるま

で凍結乾燥し、重量を測定したら5.8mgあった。(以下、この凍結乾燥標品をクロレラLPSと称す)

このクロレラLPSのリムラス活性は14.3mgに相当するので、その比活性は

$$14.3 \div 5.8 = 2.5$$

になる。

また、以上の精製で、夾雑物として存在し得る単独の糖は実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、クロレラLPSを構成している糖と考えられる。従って、この段階でのクロレラLPSの純度を重量に基づいて計算すると、

$$\text{蛋白} = 0.53 \text{ mg}$$

$$\text{LPS} = 5.8 - 0.53 = 5.27 \text{ mg}$$

だから、

$$5.27 \div 5.8 \times 100 = 91 (\%) \text{ である。}$$

#### クロレラLPSの物性

製造例1に記載の方法と同様にして、次の値が

0.00g、4℃で20分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、0~4℃の冷エタノールを6倍量加えて-20℃で一晩放置した。4.000g、4℃で30分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで2回、次いでアセトンで1回遠心洗浄し、アスピレータで乾燥させた。

残さを、20mg/mlとなるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン(Branson)社製のソニファイ185型で超音波処理(出力コントロール5、15分、室温)に付した。次いで2.500g、4℃で10分間遠心分離し、上清を分取した。

この上清を4℃で、米国シグマ(Sigma)社製の核酸分解酵素DNase I、RNase Aで15~16時間処理した(最終的には10μg/mlのDNase Iと、20μg/mlのRNase Aを使用した)。更に同じ濃度の核酸分解酵素を加えて37℃で2時間加温した。次いで2.500g、4℃で10分間遠心分離し、上清

得られた。

$$\text{分子量} = 40,000 \sim 90,000$$

$$\text{リン数} = 4 \pm 1 / \text{分子量} 1 \text{ 万}$$

$$\text{ヘキソサミン数} = 7 \pm 1 / \text{分子量} 1 \text{ 万}$$

$$\text{脂肪酸数} = 6 \pm 1 / \text{分子量} 1 \text{ 万}$$

$$\text{KDO数} = 2 \pm 1 / \text{分子量} 1 \text{ 万}$$

#### 製造例3(百日咳菌LPSの製造)

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液( $2.0 \times 10^{10}$  細胞/ml)を死菌体として用いた。

上記死菌体を25mg(乾燥重量)/mlとなるように滅菌水に懸濁した。これに等量の90%飽和フェノール液(68~70℃)を添加し、68℃で1時間揺盪しながら抽出した。8,000g、4℃で20分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の水層と合わせて流水中で一晩透析後に、ロータリーエバポレータで1/10に濃縮した。これを8,

を分取した。

この上清を米国ゲルマン(Gelman)社のアクロディスク(Acrodisc)を使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液を分子篩にかけ【樹脂：米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファロース(Sephacrose)6B、カラムサイズ=内径5cm×長さ100cm、緩衝液=10mMのトリス-HCl、10mMのNaCl(pH7.5)、流速=約3ml/cm<sup>2</sup>/時)、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液をイオン交換にかけ【樹脂：米国ファルマシア(Pharmacia)社製FPLC、樹脂：米国ファルマシア社製モノQ HR10/10、緩衝液=10mMのトリス-HCl+10mMのNaCl(pH7.5)で15分洗浄し、次いで、NaCl量を165mMに増加して30分洗浄し、次いで、20分かけて、NaCl量が165mMから1Mの濃度勾配になるよう

にNaCl量を増加させながら洗浄し、次いで、1MのNaCl量で30洗浄する、流速=2ml/分、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせた。

合わせた画分をカラムで脱塩し〔樹脂：米国ファルマシア（Pharmacia）社製セファデックスG-25ファイン（fine）、カラムサイズ=内径2cm×長さ25cm、溶出液=蒸留水〕、次いで凍結乾燥した。

この凍結乾燥標品（4.50mg）に溶入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線（200～400nm）をとり、260nmでの吸光度を求めた。吸光度1のときの核酸濃度が50μg/mlであることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出したら1%以下であった。又、SDS電気泳動では蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に溶入している蛋白質は高々0～3%と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は96%以上と推定された。

（階段状に連続したクマシー染色帯のうち、染色強度が最高のものの値である。）

リン数=12/分子量3万  
ヘキソサミン数=45±6/分子量3万  
脂肪酸数=18/分子量3万  
KDO数=5±1/分子量3万

以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

#### 実施例1（錠剤）

小麦LPS	0.04g
6%HPC乳糖	178g
ステアリン酸タルク	8g
バレイショデンプン	1.4g

以上を混和し、打錠して、0.1mgの小麦LPSを含む0.5gの錠剤400個を調製した。

製造例1に記載の方法と同様にして測定されたこの百日咳菌LPSの物性は次の通りであった。

#### 百日咳菌LPSの物性

分子量=6,000±1,000,  
9,000±1,000

（複数観察されたクマシー染色帯のうち、染色強度が最高の2つの染色帯の値である。）

リン数=5/分子量8千  
ヘキソサミン数=16±2/分子量8千  
脂肪酸数=5/分子量8千  
KDO数=2±1/分子量8千

なお、製造例1に記載の方法と同様にして測定された大腸菌LPS〔米国ディフコ（Difco）社製0128:B8〕の物性は次の通りであった。

#### 大腸菌LPSの物性

分子量=30,000±5,000

#### 実施例2（内服液剤）

クロレウLPS	1mg
精製水	100ml

#### 実施例3（軟膏剤）

小麦LPS	0.1g
精製ラノリン	80g
黄色ワセリン	適量
	1000g

#### 実施例4（注射剤）

小麦LPS	0.5mg
注射用蒸留水	適量
合計	1000ml

#### 実験例1（リムラステスト陽性植物LPSの定量）

各種植物に含まれるリムラステスト陽性LPSの定量を、生化学工業株式会社のトキシカラーステムを使って行った。

①96穴の平底または丸底プレートに注射用蒸

留水を1穴当たり180 $\mu$ l入れた。試料20 $\mu$ l（試料が固体の場合には注射用蒸留水に溶解して調製した）をプレートの穴の1つに加えた。プレートミキサーで攪拌しながらビフティングを行って10倍希釈液を調製した。（以後、順次希釈試料を20 $\mu$ lずつとり、同様に処理することで100倍、1000倍、…と10倍希釈系列液を調製できる。また、注射用蒸留水と試料の量比を変えることにより希釈率は任意に設定できる。）

②内部標準として1.5 $\mu$ g/mlの大腸菌LPS溶液の100、000倍希釈液を調製し、希釈やリムラステスト発色が正常であることを確認した。

③上記①の10倍希釈液35 $\mu$ lを別のプレートの穴にとり、生化学工業株式会社のトキシカラシステムのLS-1セット35 $\mu$ lを添加し、37℃で30分間放置した。ついで105 $\mu$ lの1M酢酸水を加えて攪拌して反応を停止させた。この試料液の波長415nmでの吸光度を、96穴用吸光度計プレートリーダーMTP-100

（コロナ電気株式会社製）で測定した。バックグラウンドとしては蒸留水を、検量線作成用としては42pg/mlの生化学工業株式会社のトキシカラシステムのET-1セットを使用して検量線を作成し、この検量線を基準にして各試料中のリムラステスト陽性LPSの定量を行った。（試料が蒸留水である場合の吸光度を0とした。）

なお、この方法で前記LS-1セットを使用した場合には10～45pg/mlの範囲内で発色に定量性があることが確認されたので、この範囲に入らないときは、希釈率を変えて再実験した。希釈試料の定量値は、

（検量線から読み取った値）×（希釈率）で計算した。

得られた結果を、固体試料の場合にはng/g単位で、液体試料の場合にはng/ml単位で表1に示す。

なお、表中の試料の欄の会社名、地名等は、当該試料の入手先、産地をさす。かかる記載がない品はスーパーストア東武屋の神奈川県津久井郡

中野町店で購入した品で、製造者が不明なものを指す。

表 1

試料（固体）	リムラステスト陽性 LPS量（ng）
蓮子植物	
松の実（農商貿易）	125
蓮子葉類	
硬質系小麦種子（千葉製粉）	2,250
硬質系小麦種子（千葉製粉） （分子量5000以上）	1,000,000
硬質系小麦粉（千葉製粉）	7,500
小麦ふすま（千葉製粉） （分子量5000以上）	300
小麦胚芽（千葉製粉）	1,600
小麦胚芽（千葉製粉） （分子量5000以上）	<10,000
玄米	1,100

米粉（日本穀粉） （分子量5000以上）	31,000,000
米ぬか	29,000
米ぬか（分子量5000以上）	500,000
コーンフラワー（大洋飼料） （分子量5000以上）	<0.3
コーングリッツ（大洋飼料） （分子量5000以上）	120
コーン（和光食糧）	200
クマ笹（関本物産）	15,000
アヤメ（種子）	3,300
ニンニク（鱈葉）	70
アスパラガス（芽）	4,500
ミョウガ（花房）	41,000
ヨクイニン（ウチダ和漢薬） （原植物は鳩麦）	2,300
ハンゲ（松浦薬業） （原植物はカラスビシャク）	5,500
バクモントウ（阪本天海堂） （原植物はジャノヒゲ）	4,000

特開平4-49240 (19)

ターメリック (エスビー食品)	195,000	カボチャ (種子)	10,000
(原植物はウコン)		トマト (生の実)	10,500
<u>双子葉類</u>		カイワレダイコン (根を除く)	50,000
大豆 (三女食品)	150	マタタビ (丸久物産)	40,000
大豆 (ほくれん) (分子量5000以上)	400	アマチャズル (K. K. 桜井)	73,000
丹波黒大豆 (和光食糧)	85	ドクダミ (湿潤重量当たり)	
小豆 (和光食糧)	450	(帝京大学薬用植物園)	1,200
小豆 (和光食糧)		胡椒 (白) (エスビー食品)	2,300
(分子量5000以上)	36,000,000	トウガラシ (興南貿易)	2,300
ひたし豆 (和光食糧)	800	八角 (興南貿易)	5,500
大正金時 (和光食糧)	550	ナツメグ (ライオン)	2,000
大福豆 (和光食糧)	350	(原植物はニクズク)	
そら豆 (生)	750	トウヒ (ウチダ和漢薬)	8,000
ジャガイモ (ほくれん)		(原植物はダイダイ)	
(分子量5000以上)	<0.3	カッコン (栃木天海堂)	3,000
ビワ (種子)	800	(原植物はクス)	
アボガド (種子)	950	ナンキンカンゾウ (ウチダ和漢薬)	18,000
モモ (種子)	4,500	オタネニンジン (ウチダ和漢薬)	45,000
クルミ (種子)	1,900	ボウフウ (栃木天海堂)	50,000
ソラ豆 (種子)	750		
カンボウイ (栃木天海堂)	600,000	わかめ芽株 (森谷健康食品)	200,000
(原植物はオオツツラフジ)		ひじき (生)	85,000
チョウトウコウ (ウチダ和漢薬)	7,000	芽ひじき (小善本店)	105,000
(原植物はウンカリフ・ヒルスタ)		ゴブ (ヤマトタカハシ)	235,000
八味地黄丸 (カネボウ薬品)	17,000	アサクサノリ (乾燥生ノリ)	130,000
小柴胡湯 (ツムラ)	13,000	クロレラ	
五苓湯 (ツムラ)	12,000	(調ヘルスター・ジャパンYS)	1,900,000
猪苓湯 (ツムラ)	14,000	クロレラ	
十全大補湯 (ツムラ)	8,000	(調マンナンフーズYS)	1,000,000
八味地黄丸 (ツムラ)	8,000	<u>菌類</u>	
ローヤルゼリー	1,000	椎茸 (下仁田産)	16,000
[ベキン ローヤルゼリー		えのき茸 (長野県中野市)	20,000
(Peking Royal Jelly)		しめじ (舞多郡宮城町)	40,000
ハチミツ (加藤美峰園本舗)	800	まいたけ (大利根)	205,000
<u>シダ植物</u>		あわび茸 (羽生)	8,000
スギナ (湿潤重量当たり)	700	マッシュルーム	20,000
(帝京大学薬用植物園)		きくらげ	75,000
ゼンマイ (関本物産)	10,000	ナメコ	21,000
<u>ソウ類</u>		エビオス (アサヒビール社製	250,000
わかめ (三陸天然品)	11,000	ビール酵母)	

冬虫夏草 240.000

その他

雪印ナチュレヨーグルト(輪雪印) 5,000

グリコビフィズスヨーグルト(輪グリコ) 50

リムラステスト陽性

試料(液体)

LPS量 (ng)

ビール

キリン ファインビルスナー 1,150

ラガービール 1,250

ハートランド 1,550

ファインドラフト 1,400

アサヒ スーパーイースト 600

ワイン

サントリー サントネージュ(白) 13

(赤) 24

シードル(アップル) 800

日本酒

大関一級(大関酒造) 2.4

黄桜二級(黄桜酒造) 1.7

大関吟醸二級(玉泉堂酒造) 2.1

玄米酒

日ター献(大関酒造) 12

薬味酒

陶陶酒デルカップ(陶陶酒本舗) 1.2

焼酎

宝焼酎(宝酒造) <2.0

その他

キョーレオピン(清水製薬) 600

ニンニク抽出液(清水製薬) 350

グロスキュー(クロレラ工業) 6,000

大塚健康メッコール(韓国・一和) 2,000

サクロンハーブ液(エーザイ) 1,000

ヘチマ水(自家製) 700

バイオアルゲン(クロレラ工業) 400

パンシロン内服液(ロート製薬) 200

ユニケルファンティー(佐藤製薬) 50

コリホグス(小林製薬) 30

ツディ(三共) 20

ミオDコーワ100(コーワ) 10

リゲイン(三共) 9

ロアレン50(第一製薬) 7

ソルマック(大腸製薬) 6

ローゼリーゴールド(中外製薬) 5

バスピタン30(常盤製薬) 5

チオビタ(大腸製薬) 5未満

リボピタン(大正製薬) 5未満

アスパラゴールド(田辺製薬) 5未満

実験例2(マクロファージのインビトロTNF産

生能を活性化させる際のED<sub>50</sub>を与えるリ

ムラステスト陽性LPSの含有量が0.

4~100ng/培養液mlであるLPS

Sの選別方法)

9週齢の、平均体重29gの各群3匹のオスのC3H/Heマウスのマクロファージ腹腔常在細胞200μl(2×10<sup>5</sup>個)/穴を96穴の平底プレートに入れ、プライマーとしての組換えマウスIFN-γ(100単位/ml)を各穴に10μl宛加えた。別途、各種LPS源を65℃の熱

水(g/ml)で5時間抽出して調整した抽出液を各種希釈し、その10μl/穴をプライマー投与の3時間後にトリガーとして加えた。2時間培養後に遠心分離操作に付した(3000g、20分)。各穴から得られた130μlの、TNF活性はL929細胞に対する毒性に基づいて測定し、又、リムラステスト陽性LPS含有量は生化学工業株式会社のトキシカラーシステムを使用して測定した。

測定値を、縦軸にTNF産生量(単位/培養液ml)を、横軸(対数尺)に対応リムラステスト陽性LPS含有量(ng/培養液ml)を表す座標にプロットし、プロットされた各点から推定されるシグモイド曲線を描いた。トリガーを投与しなかった場合のTNF産生量を与える各トリガーのマクロファージ活性化能を0%とし、トリガー投与の効果として増大するTNF産生量が最大恒量に達したときの各トリガーのマクロファージ活性化能を100%とし、その50%に相当するマクロファージ活性化能を与えるリムラステスト陽

性LPS含有量を曲線から読み取った。

マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が上記条件を満たしたLPS採取源の結果を次の表2に示す。表中で、「TNF」はTNF産生量(単位/培養液ml)を、「活性化能」はマクロファージ活性化能(%)を、「LPS」はリムラステスト陽性LPS含有量(ng/培養液ml)を表す。なお、トリガー無添加時のTNF産生量は0.75単位/mlであったので、TNF産生量が0.75単位/ml以下である場合をマクロファージ活性化能0%とし、マクロファージ活性化能(%)は次式により計算した。

$$\frac{\text{TNF産生量} - 0.75}{\text{TNF産生最大恒量} - 0.75} \times 100$$

表 2

LPS源	TNF	活性化能	LPS
ターメリック	0.75	0	0

	3.9	9	0.6
	36.3	100	60
	36.3	100	>1000
カンボイ	0.75	0	0
	40.7	100	4
	36.5	90	400
	40.7	100	>1000
コンブ	0.75	0	0
	1.3	4	0.8
	13.0	100	80
	13.0	100	>1000
アサクサノリ	0.75	0	0
	1.0	2	0.3
	12.8	100	30
	12.8	100	>1000
ワカメ芽株エキス	0.75	0	0
	1.3	4	0.2
	15.5	100	20
	15.5	100	>1000
芽ヒジキ	0.75	0	0

	5.7	8	0.7
	62.7	100	70
	62.7	100	>1000
エビオス	0.75	0	0
	0.6	0	0.7
	30.6	100	70
	30.6	100	>1000
冬虫夏草	0.75	0	0
	2.0	4	0.4
	30.3	100	40
	30.3	100	>1000
ワカメ芽株	0.75	0	0
	0.9	1	0.4
	22.7	100	40
	22.7	100	>1000
クロレラ	0.75	0	0
	39.2	100	9.6
	35.0	89	960
大腸菌LPS	0.75	0	0
	3.6	27	2

	10.2	89	20
	11.4	100	200
	10.9	95	2000
小麦LPS	0.75	0	0
	0.7	0	2
	10.1	99	21
	10.2	100	210
	8.5	82	2100
百日咳菌LPS	0.75	0	0
	0.7	0	11
	3.3	55	110
	5.4	100	1100
リビドA	0.75	0	0
	4.7	37	2
	9.4	80	24
	11.1	96	240
	11.5	100	2400

表2に示された結果を第4～7図に示す。

第4～7図において、縦軸はマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸(対数尺)はリムラス

テスト陽性LPS含有量 (ng/培養液ml) を表している。

第4図において、○はターメリックの、●はカンボウイの、□はコンブの、■はアサクサノリのデータを示す。

第5図において、○はワカメ芽株エキスの、□は芽ヒジキの、■はエビオスのデータを示す。

第6図において、○は冬虫夏草の、●はワカメ芽株の、□はクロレラのデータを示す。

第7図において、○は大腸菌LPSの、●は小麦LPSの、□は百日咳菌LPSの、■はリビドAのデータを示す。

### 実験例3 (抗消化性潰瘍効果の測定)

各群3匹のC3H/Heマウス(12週齢の雄、平均体重25g)を24時間絶食させた。但し、水は自由に摂取させた。

各群にそれぞれ50mg/匹の、製造例1の②で得られた粉末A-a<sub>2</sub>(900μg/gのリムラステスト陽性LPSを含む)、輸マンナンフー

クロレラLPS	16±8 (84%)	6.5±3.5 (60%)	77±45 (92%)
---------	---------------	------------------	----------------

### 投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で1μg~100mg、静脈投与で10ng~1mg、経皮投与で100ng~1mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。

又、小麦LPS(製造例1)、クロレラLPS(製造例2)、大腸菌LPS[米国ディフコ

ズYSから市販されている細胞膜破砕クロレラ(3mg/gのリムラステスト陽性LPSを含む)、蒸留水をゾンデで経口投与し、その1時間後に1.5mgのインドメタシンを各マウスに皮下投与し、腸胃に胃潰瘍を発生させた。

インドメタシン投与の7時間後に胃を摘出し、2%ホルマリンで固定した。胃底部を切開し、潰瘍の数、長さ、面積を測定した。結果を各群3匹の平均として次表3に表す。なお、カッコ内のデータは、蒸留水投与群の値を100%とした場合の割合を表している。なお、製造例1で得られた小麦LPSを3μg静注した場合には潰瘍発生はほぼ100%予防された。

表 3

投与薬	潰瘍数	潰瘍長 (mm)	潰瘍面積 (mm <sup>2</sup> )
蒸留水	19±8	11±3.2	84±33
粉末A-a <sub>2</sub>	7±6 (37%)	4.9±3.5 (45%)	43±38 (51%)

(Difco)社製0128:B8)、百日咳菌LPS(製造例3)の毒性値LD<sub>50</sub>(1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重45g、における平均値)は次の通りであった。

検体	LD <sub>50</sub> /kg (mg)	
	静脈内	皮内
小麦LPS	3.2	16
大腸菌LPS	3.4	16
百日咳LPS	11	32

### 【発明の効果】

本発明により、抗消化性潰瘍効果が高く副作用が少なく、従って化学療法係数が高く、かつ、生産コストが低く、しかも、経口、経皮、注射での投与が可能であり、かつ大量に供給可能であり、その上、毎日食することが可能な食品の内に配合可能な新規な抗消化性潰瘍剤、動物用抗消化性潰瘍剤が提供される。



4 図面の簡単な説明

第1図は、小麦LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

第2図は、大腸菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

第3図は、百日咳菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

第4～7図は、マクロファージ活性化能とリムラステスト陽性LPS含有量との相関関係が本発明の条件を満たしている各種LPSの当該相関関係を示すグラフである。

第4～7図において、縦軸はマクロファージ活性化能(%)を表し、横軸(対数尺)はリムラステスト陽性LPS含有量( $ng/培養液ml$ )を表している。

第4図において、○はターメリックの、●はカンボウイの、□はコンブの、■はアサクサノリの

データを示す。

第5図において、○はワカメ芽株エキスの、●は芽ヒジキの、□はエビオスのデータを示す。

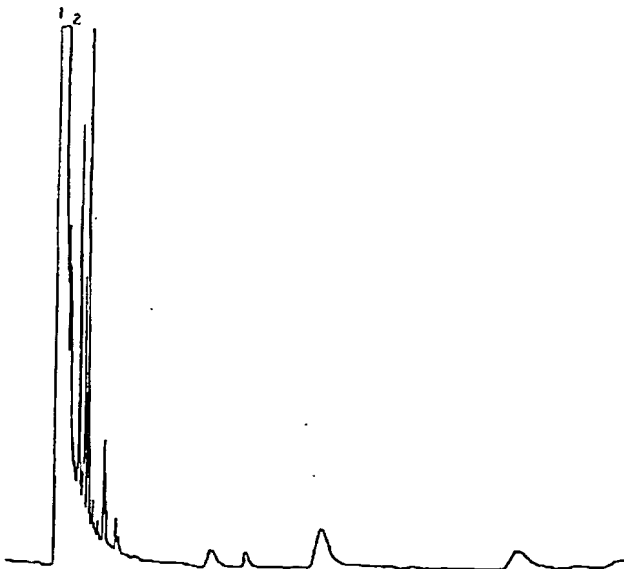
第6図において、○は冬虫夏草の、●はワカメ芽株の、□はクロレラのデータを示す。

第7図において、○は大腸菌LPSの、●は小麦LPSの、□は百日咳菌LPSの、■はリビドAのデータを示す。

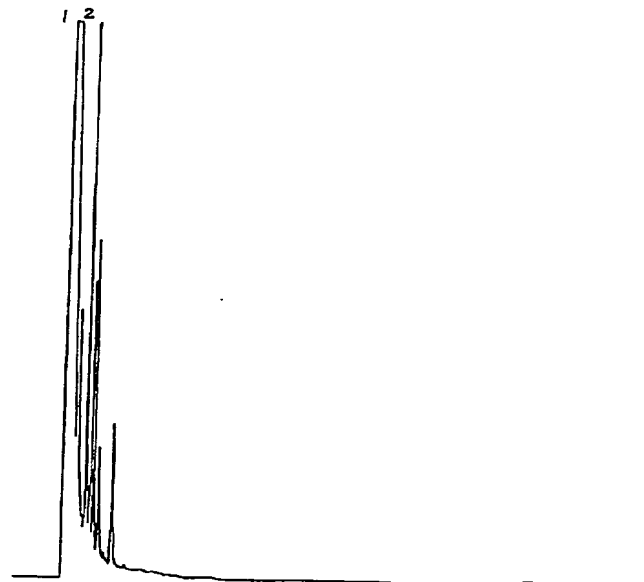
特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊彌 (ほか2名)

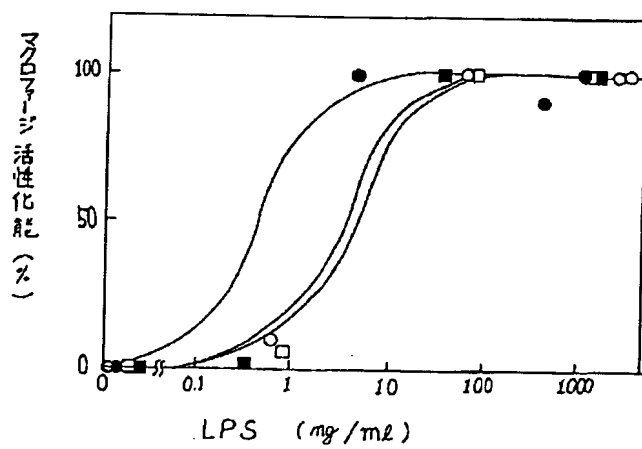
第1図



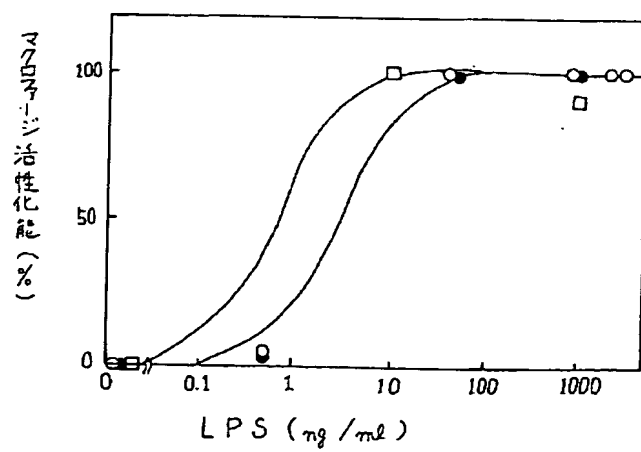
第2図



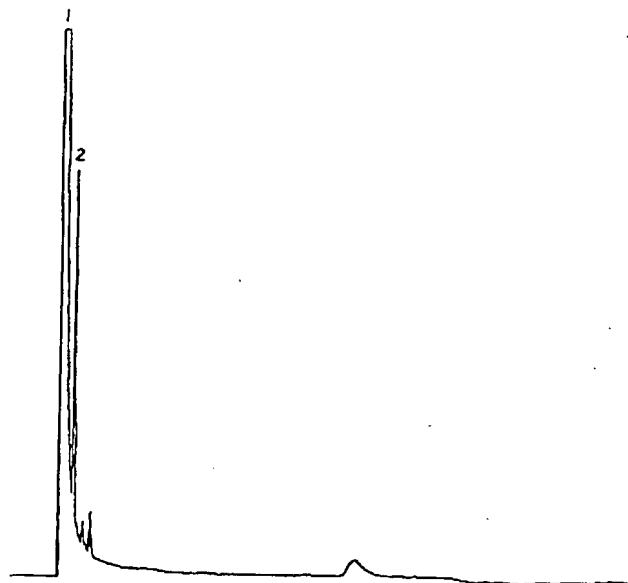
第 4 図



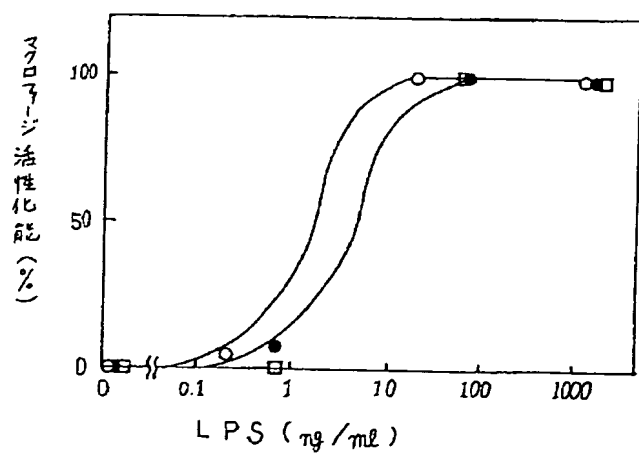
第 6 図



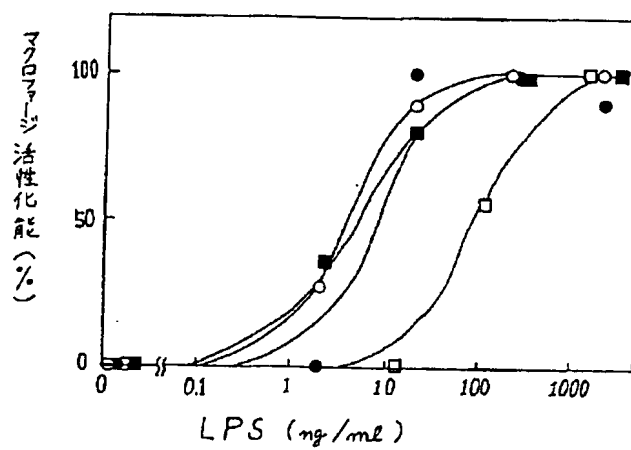
第 5 図



第 5 図



第7図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**